



TITLE:

# 小胞体品質管理機構におけるレクチンとシャペロン様因子の機能解析(Digest\_要約)

AUTHOR(S):

藤森, 力

---

CITATION:

藤森, 力. 小胞体品質管理機構におけるレクチンとシャペロン様因子の機能解析. 京都大学, 2014, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18118>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2020-07-01に公開

## 小胞体品質管理機構におけるレクチンとシャペロン様因子の機能解析

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学系 藤森 力

### [研究背景]

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成の場であり、正しい立体構造をもつタンパク質と高次構造形成に失敗したタンパク質を見分け、構造異常タンパク質は分解するという品質管理機構が存在する。哺乳類細胞において、翻訳と共役して小胞体内腔に挿入されたタンパク質は分子シャペロン BiP やそのコシャペロンである HSP40 ファミリータンパク質、ジスルフィド結合の形成を促進する PDI タンパク質などの助けによって正しい立体構造を取るようフォールディングが試みられ、正しく折りたたまれたタンパク質のみが分泌経路へ送りだされる。折りたたみに失敗したタンパク質はサイトゾルに逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。この分解機構は小胞体関連分解(ERAD:ER-associated degradation)と呼ばれる。異常タンパク質の小胞体内への蓄積は小胞体ストレスとなり、細胞の恒常性に大きな影響を及ぼす要因となる。それに対処するために、細胞は小胞体ストレス応答を惹起し、分子シャペロンや ERAD 因子などの転写を誘導して基質のフォールディング及びミスフォールドしたタンパク質の分解を促進する。

小胞体で新規生合成されるタンパク質の多くが、N 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質である。糖タンパク質のフォールディング状態の認識において、付加された糖鎖の構造が重要なシグナルとなる。レクチンシャペロンであるカルネキシン/カルレティキュリンは  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2(\text{G1M9})$  の糖鎖構造を認識して生合成直後のタンパク質のフォールディングを促進する。一方、ミスフォールドした糖タンパク質はマンノースがトリミングされたのち分解されることが知られている。近年、糖鎖認識に関わる mannose 6-phosphate receptor homology (MRH) ドメインをもつレクチン OS-9 が、マンノーストリミングの進んだ  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2(\text{M7})$  などの糖鎖構造を認識して糖タンパク質を分解に導くことが明らかにされた。哺乳類の小胞体には、もう 1 つ MRH ドメインをもつレクチン XTP3-B が存在する。OS-9 同様 XTP3-B も ERAD に関与することが示唆されていたがその機能に関してはほとんど分かっていなかった。そこでこの新規レクチン XTP3-B に注目した分子機能解析を行うことによって、タンパク質品質管理機構の解明を目指した。

また、新たなシャペロン様因子をクローニングし、その機能解析も行った。

### [目的]

①レクチン XTP3-B の糖鎖認識能を検討するため、XTP3-B リコンビナントタンパク質を精製して *in vitro* におけるレクチン活性を特定し、また、培養細胞を用いた *in vivo* 解析において XTP3-B がタンパク質品質管理機構にどのように寄与するか明らかにすることを目的とした。

②新規シャペロン様因子に関しては、*in vivo* 解析を行い相互作用するタンパク質を同定するとともに、タンパク質品質管理機構における機能を明らかにすることを目的とした。また、リコンビナントタンパク質を精製し *in vitro* での機能解析を行う。

### [研究方法]

XTP3-B リコンビナントタンパク質を精製するため、大腸菌を用いた発現系を確立し、精製条件を検討した。レクチン活性については frontal affinity chromatography (FAC) 解析法を用いて糖鎖結合能を検討した。細胞内における XTP3-B の機能に関しては、ミスフォールドしたタンパク質との結合を免疫沈降法で調べた。また siRNA 法を用いたノックダウンを行い、XTP3-B が基質の分解に及ぼす影響をパルスチェイス法で解析した。さらに、内在性 XTP3-B の複合体形成状態をショ糖密度勾配遠心法を用いて検討した。新規シャペロン様因子の機能解析においては、細胞内で相互作用するタンパク質を免疫沈降法及びショ糖密度勾配遠心法を用いて調べた。また、ミスフォールドしたタンパク質との結合能を免疫沈降法で検討するとともに、基質分解への影響をパルスチェイス法を用いて解析した。さらに、大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質の精製を行った。

## [結果]

本研究では、精製が困難であった XTP3-B リコンビナントタンパク質を大腸菌シャペロンとの融合タンパク質として精製する方法を確立した。XTP3-B は 2 つの MRH ドメインを持つが、精製タンパク質を用いた FAC 解析の結果、N 末端側の MRH1 ドメインにはレクチン活性がないが、C 末端側に存在する MRH2 ドメインは  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2(\text{M9})$  糖鎖を特異的に認識することが明らかになった。すなわち、XTP3-B は OS-9 と異なる糖鎖構造を認識することが示された。また、哺乳類細胞において XTP3-B はミスフォールドした糖タンパク質との結合が見られた。さらに、XTP3-B と基質との結合において、MRH2 ドメインのレクチン活性が重要な役割を果たし、基質に付加された M9 糖鎖を MRH2 ドメインが認識することを見出した。また、内在性 XTP3-B は小胞体膜上の HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体に含まれることが分かった。HRD1-SEL1L 複合体は ERAD に関与する多くの因子で構成されているが、XTP3-B は SEL1L を介してこの複合体に結合していることが明らかになった。SEL1L との結合が喪失すると XTP3-B は細胞内分解を受けることから、XTP3-B の安定性に SEL1L が大きく貢献していることが示された。ミスフォールドして ERAD で分解されることが知られているモデル基質 NHK の分解に及ぼす影響をパルスチェイス実験で調べたところ、XTP3-B は M9 糖鎖をもつ NHK の分解を抑制することが分かった。これは、NHK の分解を促進する OS-9 の機能とは異なっていた。また、OS-9 と XTP3-B の NHK の分解に対する相補作用は認められなかった。

次いで新たなシャペロン様因子の機能解析を行った。免疫沈降実験より、この因子に結合する細胞内タンパク質を同定した。また、ショ糖密度勾配遠心法を用いて小胞体シャペロンタンパク質などとの複合体形成状態を同定した。この因子の機能を解析するため、ミスフォールドするモデル基質との結合性や ERAD に及ぼす影響を検討した。さらに、大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現および精製法を確立した。

## [考察]

小胞体では、レクチンが糖鎖構造を認識して基質のフォールディングを助けたり、あるいは分解へと導く。本研究ではリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の実験、及び培養細胞を用いた *in vivo* の実験から、XTP3-B と OS-9 の認識する糖鎖構造の違いが明らかになった。また、XTP3-B が M9 糖鎖をもつ基質の分解を抑制することを明らかにした。M9 糖鎖はフォールディング途上のタンパク質がもつ糖鎖シグナルである。したがって、HRD1-SEL1L 複合体に結合した XTP3-B は、誤って ERAD 経路へ導かれたフォールディング途上にあるタンパク質の分解を抑制するという、新たなタンパク質品質管理機能を担っていることが示唆された。小胞体品質管理機構は、これまでミスフォールドしたタンパク質の分解過程に焦点が当てられてきた。しかし過剰な分解は細胞にとって危険であることも知られている。本研究から、フォールディング途上のタンパク質を分解しないように保護する仕組みの存在が示唆された。また、新規シャペロン様因子の機能解析においても新たな事象を明らかにした。今後の解析からこの因子の具体的な機能が明らかになることが期待される。小胞体品質管理機構の破綻によるミスフォールドしたタンパク質の蓄積は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病などの様々な疾患を引き起こすことが知られている。小胞体品質管理機構の機能解析によってこれら疾病の原因究明が期待されていることから、本研究で XTP3-B の機能解明及び新規シャペロン様因子を同定できたことは重要な知見になるものと考えている。